

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

## PATHOMORPHOLOGICAL DIAGNOSTICS OF TOXOPLASMOSIS

I.V. Lipkovska

**SUMMARY.** By post-mortem studies on toxoplasmosis 28 fetuses from missed abortion it was found out that PCR tissue diagnosis, direct microscopy of internal organs smears biopsies are more informative than the blood IFA on immunoglobulins of dead embryos by different classes to *T. gondii*.

*Individuals with long-term persistence of immunoglobulin A against *T. gondii* and relevant low-avidity immunoglobulin G, even in the absence of any clinical signs of infestation, are at risk of pregnancy planning, being probably infected low-virulence strains of *Toxoplasma*.*

**Key words:** *T. gondii*, congenital toxoplasmosis, biological sample.

Отримано 25.01.2013 р.

© Кучма І.Ю., 2013  
УДК 618.15-002.3:616.992.282

І.Ю. Кучма

## ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ЗА КРИТЕРІЯМИ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА ЧУТЛИВОСТІ ДО ПРОТИМІКРОБНИХ ЗАСОБІВ БАКТЕРІЙ РОДУ STREPTOCOCCUS, ВЕГЕТУЮЧИХ У ДИХАЛЬНІЙ СИСТЕМІ ХВОРИХ НА ПНЕВМОНІЮ ДІТЕЙ

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України

Мікробіологічна діагностика пневмонії, особливо у дітей, пов'язана з достатньо вагомими перепонами: складність отримання матеріалу для дослідження, наявність в мокротинні секрету верхніх дихальних шляхів та ротової порожнини, призначення емпіричної антибактерійної терапії. Загальновідома роль бактерій роду *Streptococcus* в етіології пневмоній, та не завжди вдається чітко віддиференціювати стрептококи, що постійно вегетують у біотопах ротоглотки і легень, від збудників захворювання з притаманними їм вираженими патогенними властивостями, полірезистентністю до протимікробних засобів, селективними перевагами, які частіше за все і викликають гострий патологічний процес у легеневій системі. З масиву бактерій роду *Streptococcus* spp., ізольованих від хворих на пневмонію дітей, вибірково досліджено фактори патогенності у полірезистентних ізолятів: лізоцимну та антилізоцимну активність, антикомплементарну активність, продукцію гіалуронідази.

**Ключові слова:** стрептококи, біологічні властивості, патогенність, чутливість до протимікробних засобів.

Концептуальною основою запобігання та боротьби з хворобами мікробного ґенезу є наукове пізнання їх суті, закономірностей виникнення, патогенезу, перебігу та реабілітації, підступів до раціонального та ефективного лікування і профілактики [1]. Наша увага була акцентована на проблемі запалень легень у педіатричній практиці. Мікробіологічна діагностика пневмонії, особливо у дітей, пов'язана з достатньо вагомими перепонами. Насамперед, це складність отримання у дітей біологічного матеріалу для дослідження, по можливості не контамінованого супутньою мікрофлорою. Наявність у мокротинні секрету верхніх дихальних шляхів, ротової порожнини та носоглотки різко знижує інформативність отриманих результатів. Призначення лікарем емпіричної антибактерійної терапії також призводить до сумніву в плані вилучення саме клінічно значущого патогену. Серологічні тести теж не завжди високоспецифічні, дають перехресні антигенні реакції, суттєво затримані в часі. Тяжкий та нерідко атипичний перебіг пневмонії у дітей на тлі наяв-

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ності супутніх хвороб, імунodefіциту та нераціональної започаткованої антибактерійної терапії також утруднює виявлення збудника [2]. У будь-якому випадку лише вилучення чистої культури мікробів та надійна їх ідентифікація надає право клініцисту підтвердити або відкинути основний діагноз. За останніми даними десятирічного моніторингу Британського торакального товариства (БТВ) [3], за бальною системою означено провідні збудники позаликарняної та нозокоміальної пневмонії в країнах Європи. Моніторинг БТВ проведено за метааналізом більше 1000 наукових публікацій за період 1999-2009 рр., проаналізовано контингенти різних вікових груп з пневмонією мікробного ґенезу в кількості більше 200 000 пацієнтів, обстежених та пролікованих стаціонарно. Суб'єктивність отриманих даних базується на тому, що майже в 30 % випадків захворювання на пневмонію навіть при найретельнішому клініко-лабораторному обстеженні не вдалось чітко означити провідного збудника [3]. В порядку зниження значущості наводимо дані щодо збудників пневмонії за даними БТВ: *S. pneumoniae* (20-37 %), *H. influenzae* (3-11 %), *S. aureus* (5-11 %), *M. catarrhalis* (3-5 %), інші грамнегативні бактерії (3-9 %), *S. pyogenes* (2-3 %), атипові збудники – легіонели, мікоплазми, хламідії (3-9 %). Віруси з причини недоказовості прямого виклику гнійно-запального процесу в дихальній системі не включено до моніторингу, хоча їм відводиться окремими дослідниками до 15 % у питомій вазі загального масиву збудників пневмонії [4].

Загальновідома роль бактерій роду *Streptococcus* в етіології пневмоній, та не завжди у клінічній практиці вдається чітко віддиференціювати стрептококи, що постійно вегетують в біоценозах та окремих біотопах ротоглотки і легень, від їх родичів із притаманними ним вираженими патогенними властивостями, полірезистентністю до протимікробних засобів, селективними перевагами, які частіше за все і викликають гострий патологічний процес у легеневій системі. Ми вважаємо важливим заповнити окремі прогалини у мікробіологічній діагностиці та підступах до ефективного і раціонального лікування гострої пневмонії у хворих на пневмонію дітей.

### Пацієнти і методи

Протягом 2006-2011 рр. обстежено 256 дітей, які перебували на лікуванні в дитячих пульмонологічних стаціонарах Харкова і Житомира з діагнозом гострої пневмонії. Первинне клініко-лабораторне обстеження хворі

проходили на базі лікувальних закладів; більш детальні мікробіологічні дослідження, визначення чутливості до протимікробних засобів, прояву патогенних властивостей мікроорганізмів виконано в лабораторії протимікробних засобів ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова НАМН України».

Для посіву матеріалу та ідентифікації культур використовували методики, що викладені в наказі № 535 від 22.04.1985 р. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», методичних рекомендаціях «Мікробіологічна діагностика стрептокової, ентерокової та пептострептокової інфекції» (Харків, 2007), Визначнику бактерій Берджі (2007).

Чутливість до антибіотиків визначали згідно з наказом МОЗ України № 167 від 05.04.2007 р. «Методичні вказівки по визначенню чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. МВ 9.9.5-143-2007».

Ідентифікацію виділених культур стрептококів та ентерококів і визначення їх чутливості до антибіотиків проводили за допомогою бактеріологічного аналізатора MikroScan autoSCAN (виробництва DADE BEHRING, США). Використовували панель RBPC9 (ідентифікація та визначення чутливості до антибіотиків грампозитивних мікроорганізмів). Результати враховували за допомогою спеціального програмного забезпечення. Всі процедури виконували за інструкціями до приладу, панелей із субстратами та щодо метрологічного контролю.

Приготування реактивів, поживних середовищ проводили згідно з ГОСТ 10444.1-84 (СТ СЗВ 3833-82) «Приготовление растворов, реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе» та ГОСТ 4919.1-77 «Методические рекомендации по организации хранения, учета и применения химических реактивов в лабораториях санэпидстанций для внедрения в работу бактериологических лабораторий» (М., 1984).

Визначення антилізоцимної активності (АЛА) проведено за рекомендаціями Бухаріна О.В., 1984 [5], адгезивних властивостей – відповідно до вказівок Бріліс В.І., 1986, антикомплементарної активності – за загальновідомими методиками [5], гіалуронідазної активності – за схемою McClean у модифікації Т.К. Міронової.

### Результати досліджень та їх обговорення

Проведено розподіл масиву ізолятів стрептококів за кількісними показниками. Встановлено, що у  $10^8$  КУО/мл наявність стрептококів визначено лише у 0,76 % хворих,  $10^7$  КУО/мл – у 4,15 %,  $10^6$  КУО/мл – у 8,77 %,  $10^5$  КУО/мл – у 20,49 %,  $10^4$  КУО/мл – у 27,21 %,  $10^3$  КУО/мл – у 39,62 %. Вказане свідчить, що у 70,19 % хворих дітей мік-

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

робне обсіменіння дихальних шляхів знаходиться на рівні  $10^3$ - $10^5$  КУО/мл, рівні  $10^6$ - $10^8$  КУО/мл зустрічаються досить рідко (8,77-4,15-0,76 % відповідно). Тобто за наведеними попередніми даними, цілком можливо було б і не відносити бактерії роду *Streptococcus* до провідних збудників пневмонії у дітей раннього віку. Виявилось, що серед вилучених стрептококів превалювали *S. pyogenes* (48,68 %), *S. mitis* (20,75 %), *S. pneumoniae* (15,84 %) та *E. faecalis* (6,04 %). Інші види (*S. mutans*, *S. dysgalacticae*, *S. salivarius*, *L. cremovis*) зустрічались порівняно рідко (1,51, 4,53, 2,26, 1,89 % відповідно). Окремо проаналізовано стан мікробіоценозу екологічної ніші дихальних шляхів у 48 дітей з ускладненою гострою пневмонією. При цьому від них ізолювано 306 культур, а саме: *Streptococcus sp.* (27,17 %): *S. pneumoniae* (11,37 %), *S. pyogenes* (10,43 %), *S. mitis* (1,90 %), *S. mutans* (1,57 %),

*E. faecalis* (0,95 %), *S. salivarius* (0,48 %), *L. cremovis* (0,47 %). У подальшому визначались стафілококи (*S. aureus* – 12,32 %, *S. epidermidis* – 16,40 %), *P. aeruginosa* (4,74 %), *E. aerogenes* (4,27 %), кишкова паличка (2,84 %), протеї та клостридії (*C. freundii*) — по 0,95 %, а також кандиди – 4,27 %. Тобто при вказаному розподілі вже однозначно в якості провідного патогену при пневмонії у хворих дітей проявились саме бактерії роду *Streptococcus*.

В подальшому основна увага сконцентрована на поглибленому дослідженні ізолятів стрептококів, перш за все в аспекті їх чутливості до антибіотиків, які використовуються при лікуванні пневмоній у сучасній пульмонологічній клініці, а також наявності та ступеня прояву за фенотипом їх патогенних властивостей. У таблиці 1 наведено розподіл за чутливістю до протимікробних засобів *S. pyogenes* та *S. pneumoniae*.

Таблиця 1

Чутливість до антибіотиків і антисептиків видів стрептококів, що превалюють у верхніх дихальних шляхах хворих на пневмонію дітей

Протимікробні засоби	<i>S. pyogenes</i> , %			<i>S. pneumoniae</i> , %		
	R	I	S	R	I	S
Амоксицилін	17,05	19,38	63,57	19,05	23,81	57,14
Амоксицилін/ клавулонат	8,53	16,28	75,19	11,90	16,67	71,43
Цефепім	6,20	24,03	69,77	7,14	14,29	78,57
Цефураксим	5,43	21,71	71,32	7,14	19,05	73,81
Цефотаксим	5,43	22,48	70,54	7,14	16,67	71,43
Цефтазидим	3,88	20,93	75,19	4,76	11,90	83,33
Цефтриаксон	5,43	20,16	72,87	4,76	9,52	85,71
Азитроміцин	4,65	13,18	79,84	2,38	7,14	90,48
Лінкоміцин	9,30	17,05	73,64	11,90	16,67	71,43
Хлорамфенікол	10,08	25,58	64,34	14,29	21,43	64,29
Доксициклін	24,81	41,86	33,33	21,43	26,19	52,38
Левовфлоксацин	25,58	45,74	28,68	23,81	47,62	28,57
Фуразидин	6,98	16,28	76,74	4,76	7,14	88,10
Рифампіцин	6,20	9,30	84,50	11,90	14,29	73,81
Декаметоксин	2,33	6,98	90,70	2,38	7,14	90,48
Етакридин	3,10	8,53	87,60	4,76	9,52	85,71

Примітки: R – резистентні, I – помірно чутливі, S – чутливі.

Упереджено означено чутливість вилучених стрептококів до протимікробних засобів (антибіотики, антисептики та дезінфектанти) у зв'язку з тим, щоб у подальшому досліджувати патогенність лише ізолятів з полірезистентністю до антибіотиків, а також стійких до антисептиків та дезінфектантів. На жаль, дослідити патогенні властивості всіх вилучених стрептококів не стало можливим, перш за все за їх вельми великим масивом, а також і за причини, на наш погляд, незначної вірогідності

їх провідного значення в якості збудників гнійно-запальних процесів у хворих на пневмонію дітей. Ми вважали, що за провідних збудників слід вважати лише резистентні до протимікробних засобів стрептококи, які при цьому володіють достатньо вираженими патогенними властивостями. Вказане значною мірою підтвердилось, про що свідчать наведені нижче дані.

Нами також надано характеристику та ступінь прояву факторів патогенності (адгезія, лізоцим-

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

на, протилізоцимна та антикомплементарна активності) клінічно значущих ізолятів бактерій роду *Streptococcus*. Досліджено адгезивність стрептококів за середнім показником адгезії (СПА) та

індексом адгезивності (ІА). У таблиці 2 наведено дані за вказаними критеріями процесу адгезії стрептококів відносно еритроцитів людини.

Таблиця 2

Показники адгезивності клінічно значущих стрептококів, ізольованих від хворих на пневмонію дітей (M±m)

Вид стрептококів	Кількість проб	Показники адгезії		
		СПА	КА, %	ІА
<i>S. pyogenes</i>	32	2,69 ± 1,41*	86,84	3,08 ± 1,62
<i>S. pneumoniae</i>	35	4,01 ± 1,01	90,32	4,41 ± 0,12
<i>S. viridans</i>	12	2,79 ± 0,64*	87,50	3,29 ± 0,63*
<i>E. faecalis</i>	3	1,20 ± 0,41	62,60	1,92 ± 0,64

Доведено, що актуальні ізоляти різних видів бактерій роду *Streptococcus* володіють (хоча і в різному ступені – найбільший у *S. pneumoniae*) достатньо вираженими адгезивними властивостями, що опосередковано (адже адгезія досліджена відносно лише клітин крові) свідчить за можливість селективної колонізації відповідної екологічної ніші.

У порівняльному аспекті проведено дослідження кореляції між ступенем адгезивності *Streptococcus spp.*, вилучених від хворих на пневмонію дітей, та їх чутливістю до протимікробних засобів. Доведено, що вказані властивості дійсно корелюють (в межах до 78,9 %), тобто саме полі-

резистентні до антибіотиків ізоляти стрептококів володіють вираженою здатністю до адгезії за всіма означеними критеріями.

Вибірково охарактеризовано лізоцимну та протилізоцимну активність клінічно актуальних ізолятів роду *Streptococcus spp.* За показниками прояву дії власного лізоциму (ЛА – лізоцимна активність), що надає селективну перевагу мікробу у гетерогенній популяції, а також антилізоцимної активності (АЛА) як фактора захисту від лізоциму асоціантів, досліджено ступені стійкості ізолятів стрептококів до природного прояву антагонізму співчленів мікробіоценозу в окремій екологічній ніші (табл. 3).

Таблиця 3

Ступінь прояву лізоцимної та антилізоцимної активності бактерій роду *Streptococcus*, ізольованих від хворих на пневмонію дітей

Вид стрептококів	Кількість проб	Частота ЛА, %	АЛА	
			%	мкг/мл на одиницю оптичної щільності, (M±m)
<i>S. pyogenes</i>	32	21,93	83,33	1,99 ± 1,36
<i>S. pneumoniae</i>	35	59,52	91,94	3,19 ± 1,58
<i>S. viridans</i>	12	8,47	20,34	1,25 ± 0,58
<i>E. faecalis</i>	3	31,25	81,25	2,45 ± 1,11

Надані в таблиці 3 результати, на наш погляд, цікаві з різних сторін. По-перше, при порівняно низькій лізоцимній активності *S. pyogenes* (21,93 %) та *E. faecalis* (31,25 %) володіють достатньо вираженою протилізоцимною дією (83,33 та 81,25 % відповідно). По-друге, *S. pneumoniae* одночасно володіють високою лізоцимною (59,52 %) та антилізоцимною (91,94 %) активністю. Не виключено, що у піогенних стрептококів та фекальних ен-

терококів фенотипічний прояв лізоцимної активності загальмований окремими механізмами, наприклад, інгібуючою дією системи комплементу. В різних варіантах (5-10-20 CH<sub>50</sub>/мл) досліджено антикомплементарну активність (АКА) ізолятів стрептококів різних видів. У таблиці 4 наведено дані щодо ступеня протикомплементарної дії вилучених від хворих на пневмонію дітей бактерій роду *Streptococcus*.

Таблиця 4

Антикомлементарна активність стрептококів різних видів, ізольованих від хворих на пневмонію дітей

Вид стрептококів	Кількість штамів, абс.	Ступінь протикомплементарної дії, %		
		5 CH <sub>50</sub> /мл	10 CH <sub>50</sub> /мл	20 CH <sub>50</sub> /мл
<i>S. pyogenes</i>	32	98,22	89,47	30,70
<i>S. pneumoniae</i>	35	98,39	90,32	66,13
<i>S. viridans</i>	12	58,90	42,46	6,85
<i>E. faecalis</i>	3	43,75	31,25	18,75

З масиву охарактеризованих бактерій роду *Streptococcus spp.*, ізольованих від пацієнтів з ускладненням пневмонією, досліджено продукцію ними гіалуронідази. Роль цього ферменту інвазії загальнонодома. З досліджених ізолятів 87 % *S. pyogenes* та 68 % *S. pneumoniae* продукували гіалуронідазу.

### Висновки

1. В якості провідного патогену при пневмонії у хворих дітей проявились бактерії роду *Streptococcus* (27,17 %): *S. pneumoniae* (в 11,37 %), *S. pyogenes* (10,43 %), *S. mitis* (1,90 %), *S. mutans* (1,57 %), *E. faecalis* (0,95 %), *S. salivarius* (0,48 %), *L. cremovis* (0,47 %).

2. Доведено, що актуальні ізоляти різних видів бактерій роду *Streptococcus* володіють (хоча і в різному ступені – найбільший у *S. pneumoniae*) достатньо вираженими адгезивними властивостями.

3. При порівняно низькій лізоцимній активності *S. pyogenes* (21,93 %) та *E. faecalis* (31,25 %) володіють достатньо вираженою протилізоцимною дією – 83,33 та 81,25 % з вилучених штамів відповідно. *S. pneumoniae*, вилучені від дітей з ускладненою пневмонією, одночасно володіють високою лізоцимною (59,52 %) та антилізоцимною (91,94 %) активністю.

4. З досліджених ізолятів, вилучених від дітей з ускладненою пневмонією, 87 % *S. pyogenes* та 68 % *S. pneumoniae* продукували гіалуронідазу.

5. За провідних збудників пневмонії у дітей слід вважати лише резистентні до протимікробних засобів стрептококи, які при цьому володіють достатньо вираженими патогенними властивостями.

### Література

1. Мизерницкий Ю.А. Детский научно-практический пульмонологический центр Министерства здравоохранения Российской Федерации: состояние и ближайшие перспективы / Ю.А. Мизерницкий, С.Ю. Каганов // Росс. вест. перинатол. и педиатрии. – 2002. – № 5. – С. 59-62.
2. Сміян О.І. Клініко-морфологічні зіставлення при гострій пневмонії у дітей раннього віку / О.І. Сміян, А.М. Романюк / Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2004. – № 5 (405). – С. 11.

3. American Thoracic Society. Guidelines for the initial management of adults with community-acquired pneumonia: diagnosis, assessment of severity, and initial antimicrobial therapy // Am. Rev. Resp. Dis. – 2009. – N 148. – P. 1418.

4. Chastre J. Diagnosis and treatment of nosocomial pneumonia in patients in intensive care units / J. Chastre // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 21(Suppl 3). – P. 226.

5. Базарнова М.А. Клінічна лабораторна діагностика / М.А. Базарнова. – Київ : Вища школа, 2001. – 255 с.

### HETEROGENEITY UNDER THE CRITERIONS OF BIOLOGICAL PROPERTIES AND SENSITIVITY TO ANTIMICROBIAL REMEDIES OF BACTERIA OF GENUS OF STREPTOCOCCUS VEGETATED IN BREATHING SYSTEM IN CHILDREN WITH PNEUMONIA

I.Yu. Kuchma

**SUMMARY.** Microbiological diagnostics of pneumonia, especially in children, related to the ponderable enough barriers: complication of receipt of material for research, presence at the sputum secret of overhead respiratory tracts and oral cavity, setting of empiric antibacterial therapy. A well-known role of bacteria of genus of *Streptococcus* is in etiology of pneumonias, and not always it is succeeded expressly differentiated streptococcus, that constantly persistent of overhead respiratory tracts and lights, from infants with inherent them by the expressed pathogenic properties, resists to antibacterial facilities, by selective advantages which more frequent and cause a sharp pathological process in the pulmonary system. From the array of bacteria of *Streptococcus spp.*, isolated from patients children with pneumonia, preferentially investigational factors of pathogenicity at pdy resistant isolates: lisocime and antilysocime activity, antikomplementarum activity, products of gyaluronidaze.

**Key words:** streptococcus, biological properties, pathogenicity, sensitiveness to antimicrobial remedies.

Отримано 17.05.2012 р.